ZEITSCHRIFT
FÜR
HYGIENE
UND
INFEKTIONSKRANKHEITEN

BEGRÜNDET VON ROBERT KOCH UND CARL FLÜGGE

HERAUSGEGEBEN
VON

F. NEUFELD, BERLIN — M. HAHN, BERLIN — R. DOERR, BASEL

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sonderabdruck aus Band 105, Heft 1

C. Hallauer:

Zur Chemie der bakteriellen Toxine

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
UNIVERSITÄT BASEL
VORGELEGT VON

CURT HALLAUER
AUS BASEL

BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1925

Die **„Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten“** erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials zwanglos in einzeln berechneten Heften, deren vier einen Band bilden. Der Band umfaßt ca. 40—50 Druckbogen.

Das Honorar beträgt M. 40.— für den 16 seitigen Druckbogen.

An Sonderdrucken werden den Herren Mitarbeitern von jeder Arbeit im Umfange von nicht mehr als 24 Druckseiten bis 100 Exemplare, von größeren Arbeiten bis zu 60 Exemplare kostenfrei geliefert. Doch bittet die Verlagsbuchhandlung, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Exemplare werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, die Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Beiträge sind an

Herrn Geh. Med.-Rat Prof. Dr. F. Neufeld, Direktor des Instituts für Infektionskrankheiten „Robert Koch“, Berlin N 39, Föhrer Str. 2/3

oder

Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. M. Hahn, Direktor des Hygienischen Instituts der Universität Berlin, Berlin NW 7, Dorotheenstr. 28

oder

Herrn Professor Dr. R. Doerr. Direktor des Hygienischen Instituts der Universität Basel, Basel, Petersplatz 10

postfrei einzusenden.

Im Interesse der unbedingt gebotenen Sparsamkeit wollen die Herren Mitarbeiter auf knappeste Fassung ihrer Arbeiten und Beschränkung auf das unbedingt erforderliche Abbildungsmaterial bedacht sein.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer in Berlin W 9, Linkstr. 23/24
Fernsprecher: Amt Kurfürst, 6050—6053. Drahtanschrift: Springerbuch-Berlin
Reichsbank-Giro-Konto u. Deutsche Bank, Berlin, Dep.-Kasse C
Postscheck-Konten { für Bezug von Zeitschriften und einzelnen Heften: Berlin Nr. 20120 Julius Springer, Bezugsabteilung für Zeitschriften;
für Anzeigen, Beilagen und Bücherbezug: Berlin Nr. 118935 Julius Springer.

105. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 1. Heft.

Seite

Schütz, Victor. Beiträge zur Kenntnis der Guarnierischen Körperchen. (Mit 8 Textabbildungen) 1
Marcuse, Kurt. Untersuchungen über das d'Herellesche Phänomen. III. Mitteilung. Beziehungen zwischen Bakteriophagie und Agglutination (Receptorenstudien) 17
Korff-Petersen, A., und **M. Ogata.** Der Einfluß verschiedenfarbigen Lichtes auf die Schnelligkeit des Erkennens von Druckzeichen. (Mit 2 Textabbildungen) 27
von Scheurlen. Der Kropf und seine Bekämpfung in Württemberg 45
Kondo, Seigo, und **Rishichi Nodake.** Über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Entwicklung der sogenannten Leprabacillen auf künstlichen Nährböden 67
Eguchi, Ch. Versuche über Infektion und Immunisierung junger und alter Mäuse und Meerschweinchen mit Pneumokokken und Streptokokken durch Fütterung und Inhalation 74
Eguchi, Ch. Versuche über Infektion und Immunisierung per os an jungen und alten Mäusen und Meerschweinchen mit Rotlauf, Mäusetyphus, Typhus und Ruhr 91
Horowitz-Wlassowa, L. Zur Frage der Abwässerreinigung mittels des „aktivierten Schlammes“ 98
Nuck, Kurt. Untersuchungen über die Wärmeökonomie isolierter und nichtisolierter Siedlungsbauten in hygienischer und wirtschaftlicher Beziehung. (Mit 27 Textabbildungen) 113
Hallauer, C. Zur Chemie der bakteriellen Toxine 138
Hahn, M., und **J. Hirsch.** Studien zur Verkehrshygiene. I. Eine Methode zur Bestimmung kohlenstoffhaltiger Gase in der Luft. (Mit 3 Textabbildungen) 165
Otto, R., und **E. Cronheim.** Zur biologischen Differenzierung von Ratten- und Mäuseserumeiweiß 181
Blumenberg, W., und **W. Möhrke.** Zur Bakteriolyse der Tuberkelbacillen 186
Munter, H., und **K. Rasch.** Über die Natur des bakteriophagen Lysins. (Mit 8 Textabbildungen) 205

Fortsetzung siehe III. Umschlagseite!

VON DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT BASEL
GENEHMIGT AUF ANTRAG VON DEKAN PROF. DR. DOERR

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel. — Vorstand: Prof. *R. Doerr.*)

Zur Chemie der bakteriellen Toxine.

Von
Dr. **C. Hallauer.**

Wässerige Lösungen bakterieller Toxine zeigen die allgemeine und schon aus diesem Grunde höchst interessante Eigenschaft, daß sie ihre spezifische Giftwirkung einbüßen, wenn man Säuren in bestimmten niedrigen Konzentrationen zusetzt, daß aber die ursprüngliche Toxizität ganz oder zum größten Teile wiederkehrt, wenn die zugesetzte Säure durch starke Basen neutralisiert wird.

Vereinzelte Beobachtungen dieser Art hatten schon *Roux* und *Yersin* 1889 beim Diphtherietoxin, *Chantemesse* 1898 bei den toxischen Filtraten von Typhusbouillonkulturen, *Ritchie* 1904 beim Tetanospasmin gemacht; obwohl diese Angaben mit den landläufigen Anschauungen über die große Labilität des Toxinmoleküls in offenkundigem Widerspruch standen, fanden sie doch keine Beachtung. Der Grund hierfür lag zunächst darin, daß die von den genannten Autoren verwendeten und nicht genauer präzisierten Versuchsanordnungen nicht immer reproduzierbar waren. Die Ergebnisse von *Chantemesse* z. B. wurden von *Behring* angefochten, und mit dem Tetanospasmin hatten *Fermi* und *Pernossi* schon 10 Jahre vor *Ritchie* negative Resultate erhalten, indem ihnen eine Regeneration der durch Säure entgifteten Lösungen von Tetanotoxin nicht gelang. Selbst dort aber, wo die tatsächliche Existenz des Phänomens zugegeben oder bestätigt wurde, erhoben sich Zweifel an seiner Bedeutung. *Ritchie* (zitiert nach *Arrhenius*) versuchte nämlich den Mechanismus der Erscheinung durch die Annahme zu erklären, daß das Tetanusgift infolge der Einwirkung der Säure zerstört und durch den Zusatz der Base wieder hergestellt wird; wenn auch ohne weiteres eingeräumt werden muß, daß diese Formulierung etwas primitiv anmutet und daß speziell der Ausdruck „zerstört" keinesfalls glücklich gewählt war, ist es doch andererseits klar, daß der von *Ritchie* ausgesprochene Gedanke in geänderter Form nichtsdestoweniger richtig sein konnte und daß er sich in diesem Falle als Ausgangspunkt eignen würde, um in die chemische Natur der Toxine oder doch wenigstens in die chemischen Bedingungen ihrer biologischen Wirkungen (Giftigkeit und Antigenfunktion) tiefer einzudringen. *Arrhenius* klammerte sich jedoch in seiner 1907 erschienenen „Immunochemie" an den Wortlaut der von *Ritchie* gegebenen Erklärung und meinte, „es sei gar nicht nötig, einen so wunderbaren Vorgang, wie die Wiederherstellung zerstörter Toxinmoleküle durch den Zusatz der Base anzunehmen". *Arrhenius* betrachtete die Inaktivierung bakterieller Toxine durch Säuren als einen irreversiblen Prozeß; die Reaktivierung, die man nach Neutralisation der Säure de facto beobachtet, ist nach seiner Auffassung bloß vorgetäuscht, und zwar durch den Umstand, daß die Experimentatoren den Einfluß der Temperatur auf die zwischen Toxin und Säure ablaufende Reaktion

vernachlässigten. In den bisherigen Versuchen — speziell auch in jenen von *Ritchie* — ließ man relativ niedrige Säurekonzentrationen bei Zimmertemperatur auf die gelösten Gifte einwirken, und *Arrhenius* stellte sich nun vor, daß das Toxin unter diesen Verhältnissen nur partiell zerstört wird. Injiziert man nun das Toxinsäuregemisch einem empfänglichen Tiere subcutan, so wird es plötzlich auf die Körpertemperatur, auf 37° erwärmt, und der Destruktionsprozeß schreitet infolgedessen mit sprunghaft erhöhter Beschleunigung (nach den Berechnungen von *Arrhenius* 200 000 mal rascher als bei 20°) fort; der im injizierten Flüssigkeitsvolum noch vorhandene Rest unveränderten Toxins wird daher im Organismus „fast augenblicklich" zerstört, bevor noch eine letale Dosis von der Subcutis aus resorbiert werden kann. Neutralisiert man dagegen vor der Injektion, so fällt natürlich die nachträgliche Wirkung der Säure auf das Toxin im warmen Tierkörper aus und der noch intakte Giftrest tritt ungehindert in Aktion.

Noch im selben Jahre (1907) erschienen aber zwei Arbeiten von *Doerr* (Wien. klin. Wochenschr. **20**, Heft 1 und Biochem. Zeitschr. **7**, 128), in welchen die Unhaltbarkeit der von *Arrhenius* versuchten Interpretation überzeugend nachgewiesen wurde. *Doerr* konnte vor allem zeigen, daß sich Säuretoxingemische auch dann noch reaktivieren lassen, wenn man sie vor dem Zusatz der Base 24 Stunden oder noch längere Zeit bei 37° stehen läßt; wären die Berechnungen von *Arrhenius* richtig, so müßte die völlige Zerstörung des Toxins vor der Neutralisation der Säure längst erfolgt sein und eine erhöhte Toxizität der alkalisierten Lösungen könnte unmöglich in Erscheinung treten. Abgesehen davon vermochte *Doerr* die Inaktivierung durch Säuren und die Regeneration durch Basen auch dann zu konstatieren, wenn er die betreffenden Toxinlösungen nicht subcutan, sondern intravenös injizierte, in welch letzterem Falle eine nachträgliche Säurewirkung im Organismus wegen der abpuffernden Effekte der im Blutplasma enthaltenen Salze so gut wie ausgeschlossen war. Die Ansichten von *Arrhenius* ließen sich übrigens auch mit den kurze Zeit vor *Doerr* veröffentlichten Untersuchungen von *Morgenroth* über das Kobragift nicht in Einklang bringen, aus denen hervorging, daß die hämolytische und die neurotoxische Komponente dieses antigenen Toxins gleichfalls durch Säure ($^{n}/_{20}$-HCl) weitgehend abgeschwächt und durch Neutralisation der Säure nahezu quantitativ wieder regeneriert werden kann; denn das „saure" Kobragift war hervorragend thermostabil und konnte sogar zum Sieden erhitzt werden, ohne daß die Reversibilität durch diese hohen Temperaturen vollständig aufgehoben wurde. Ferner hatte *Morgenroth* die Säuretoxingemische knapp vor der Titration ihrer hämolytischen und neurotoxischen Fähigkeiten exakt neutralisiert, so daß eine nachträgliche Toxinzerstörung in der Eprouvette oder im Tierkörper durch mitgeschleppte überschüssige Säure gar nicht in Betracht kam.

Die Versuche von *Doerr* brachten jedoch auch in positiver Richtung einige wesentliche Fortschritte, indem sie die Bedingungen, unter denen das Phänomen der Inaktivierung durch Säuren und der Reaktivierung durch Basen zu beobachten ist, exakter präzisierten als das bisher geschehen war; es wurden bis zu einem gewissen Grade brauchbare Angaben über die erforderlichen Säure- und Laugenkonzentrationen, über den zeitlichen Ablauf der Inaktivierung und der Reaktivierung und über das differente Verhalten der verschiedenen Bakterientoxine gemacht, von denen sich in erster Linie das Gift der Shiga-Kruse-Bacillen, dann auch das Diphtherietoxin, in geringerem Grade das Staphylotoxin als geeignet erwiesen, während es beim Tetanospasmin, beim Rauschbrand- und beim El-Tor-Gift nicht möglich war, die durch Ansäuern verlorene Giftigkeit durch Abstumpfung der Säure wieder zum Vorschein zu bringen. Ob die negativen Resultate mit den letztgenannten antigenen Giften nicht nur darauf beruhten, daß *Doerr* die Ver-

suchsfaktoren zu wenig variierte, muß allerdings in Anbetracht der positiven Ergebnisse, die *Ritchie* mit dem Tetanospasmin erzielt hatte, als fraglich bezeichnet werden.

Die theoretischen Ausführungen *Doerrs* über das Wesen der Säure-Toxinreaktion lauteten nur insofern bestimmt, als ein *chemischer* Vorgang als erwiesen angenommen wurde; ob es sich dabei um eine Salzbildung oder um eine intramolekulare Umlagerung handelt, ließ *Doerr* unentschieden. Verschiedene Anhaltspunkte, die sich aus seinen Versuchen ergeben hatten, ließen ihn vermuten, daß die Reaktion zwischen Toxin und Säure unvollständig verläuft, derart, daß die angesäuerten Giftlösungen neben der neuentstandenen atoxischen, aber reversiblen Modifikation des Toxins noch Reste von unverändertem Toxin enthalten; er kam ferner zu der Überzeugung, daß die reversiblen Toxinderivate nur eine je nach der Natur des verwendeten Toxins mehr oder weniger labile Zwischenstufe darstellen, die schließlich bei genügend langer Säurewirkung zur Gänze in irreversible Produkte übergeführt wird. Am stabilsten erwiesen sich die reversiblen Zwischenstufen des Dysenterietoxins, die in dieser Beziehung den durch Säurewirkung erhältlichen Modifikationen des Kobragiftes glichen, während die Toxizität angesäuerter Lösungen von Diphtherietoxin nach längerem Stehen (50 Tage) nicht mehr regeneriert werden konnte. Aus dem Verhalten saurer und wieder alkalisierter Giftlösungen zu einem bestimmten antitoxischen Serum zog endlich *Doerr* den Schluß, daß sowohl die reversiblen, als auch ein Teil der irreversiblen Toxinabkömmlinge Antikörper zu binden vermögen d. h. mit Antigenfunktionen ausgestattet sind, so daß sich somit die aufeinanderfolgenden Etappen der Säure-Toxinreaktion durch das nachstehende Schema wiedergeben lassen würden:

Natives Toxin
↓
atoxische, reversible, antigene Derivate
↓
atoxische, irreversible, antigene Produkte
↓
atoxische, irreversible Endprodukte ohne Antigenfunktion.

Selbstverständlich können in einer angesäuerten Giftlösung alle vier Gruppen von Körpern — falls die Vorstellungen von *Doerr* den Tatsachen entsprechen — gleichzeitig vorhanden sein und es kommt nur auf die Dauer der Säurewirkung an, ob und in welchem Grade die eine oder die andere Art von Toxinderivaten vorherrscht; das Ende der Reaktion wäre erreicht, wenn die gesamte, ursprünglich im Reaktionsvolum vorhandene Toxinmenge in ungiftige und nichtantigene Spaltlinge umgesetzt ist.

Doerr betonte selbst, daß die von ihm geäußerten Ansichten einer eingehenderen experimentellen Begründung bedürftig seien, hat sich aber in der Folge nicht mehr mit dem Thema befaßt. Soweit dies aus der mir zugänglichen Literatur zu entnehmen ist, wurde auch von anderer Seite kein Versuch unternommen, das Studium der Einwirkung von Säuren und Alkalien auf bakterielle Toxine fortzusetzen. In dem mit großer Gründlichkeit abgefaßten, 1925 publizierten Werke von *G. H. Wells*, „The chemical aspects of immunity" wird die ganze Frage mit der Bemerkung abgetan: „Many of the toxins when inhibited by treatment with acids of suitably low concentrations have their activity restored by neutralization (*Doerr*)." Nur *Kirschbaum* und *Fränkel* kamen auf die Angelegenheit noch einmal (Wien. klin. Wochenschr. **27**, S. 289 und 291) zurück. *Fränkel* wollte die in Bouillonkulturen enthaltenen Toxine von den übrigen Bestandteilen der Bouillon durch Ultrafiltration soweit als möglich abtrennen. Als Ausgangsmaterial wurde eine giftige, von den Bakterienleibern befreite Bouillonkultur von Shigabacillen ge-

wählt und durch ein $4^1/_2$proz. Eisessig-Kollodiumfilter unter 6 Atmosphären Druck hindurchgepreßt. Das abtropfende Filtrat war klar, ungiftig und vermochte im Tierkörper keine aktiv immunisierende Wirkung zu entfalten. Der sirupöse Filterrückstand reagierte zunächst alkalisch und zeigte in diesem Zustande die gesamte Toxizität der Ausgangslösung. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem, leicht carbolisiertem Wasser entstand im Filterrückstand unter gleichzeitigem Auftreten einer sauren Reaktion ein Präcipitat, das in reinem Wasser unlöslich und ungiftig war; in kohlensauren Alkalien ($^{200}/_n$-Sodalösung) ging dieser Niederschlag in Lösung und die Lösung erwies sich wieder als toxisch. Ansäuern der alkalischen Lösung bewirkte erneute Ausflockung und Einbuße der charakteristischen Giftigkeit für Kaninchen. Der bei saurer Reaktion ausflockende Stoff hatte in chemischer Beziehung die Eigenschaften eines niederen Eiweißspaltproduktes, dessen Molekulargewicht von *S. Fränkel* auf 1600 geschätzt wurde; er gab deutliche Biuretreaktion, positive Reaktion mit dem *Millon*schen Reagens (Gehalt an Tyrosin), enthielt aber keinen Schwefel, keine Kohlenhydratgruppe und anscheinend auch kein Tryptophan; obwohl er, wie erwähnt, ungiftig war, wirkte er „hervorragend immunisierend" und rief im Kaninchenorganismus nicht nur die Bildung von Agglutininen, sondern auch aktive antitoxische Immunität hervor. Er wurde von *S. Fränkel* als „Atoxin" bezeichnet; *Fränkel* nahm an, daß dieses wasserunlösliche, ungiftige, mit Antigenfunktionen ausgestattete „Atoxin" eine saure organische Verbindung darstelle, welche durch den Hinzutritt eines Metallions (Alkaliions) in das giftige Toxin übergeführt wird; die Formel für diesen Vorgang wäre also nach *Fränkel*:

$$\text{Saures Atoxin-Antigen plus } Na^+ = \text{Toxin.}$$

Auf eine eingehendere Kritik der *Fränkel*schen Theorie kann an dieser Stelle um so mehr verzichtet werden als die Diskussion der hier mitgeteilten Versuchsergebnisse ohnehin Anlaß bieten wird, auf ihren wesentlichsten Inhalt zurückzukommen. Es mögen daher einige Bemerkungen zwecks vorläufiger Orientierung über die Stichhaltigkeit der von *Fränkel* vertretenen Auffassung genügen.

Kirschbaum und *Fränkel* gehen von der Voraussetzung aus, daß es ihnen geglückt sei, das Gift der Dysenteriebacillen „ohne Verlust weit reiner darzustellen als es mit anderen bis jetzt angewendeten Verfahren möglich war", mit anderen Worten, daß der auf dem Ultrafilter entstandene, als „Atoxin" bezeichnete Niederschlag der Hauptsache nach aus der ungiftigen Modifikation des reinen Dysenterietoxins bestand. Die Dosis letalis des Niederschlages betrug aber (in Trockensubstanz ausgedrückt) noch immer 0,00005 g pro kg Kaninchen und es wurden wiederholt Bouillonkulturen erhalten, die selbst nach der Filtration durch Hartkerzen noch in Mengen von 0,01—0,005 ccm für 1 kg Kaninchenlebendgewicht tödlich waren; solche Bouillonkulturfiltrate würden bei einfacher Trocknung ohne jede Reinigung Pulver liefern, welche in Dosen von höchstens 0,001—0,0005 g 1 kg Kaninchen zu töten vermögen. Die in der Erniedrigung der letalen Giftdosis zum Ausdruck gelangende „Reinigung" des Toxins war somit bei der von *S. Fränkel* benützten Methodik relativ gering, der auf der Eisessig-Kollodiummembran entstandene Niederschlag enthielt allem Anscheine nach noch reichlich verunreinigende, schwer filtrierbare, aus dem Ausgangsmaterial stammende Substanzen (Albumosen, Peptone, Bakterienzerfallsprodukte u. dgl.). Abgesehen davon versteht man nicht, warum die bei saurer Reaktion ausfallende Substanz ungiftig war und ihre Toxizität erst nach dem Auflösen in kohlensauren Alkalien zurückgewann. *Kirschbaum* meint, die Unlöslichkeit der „sauren" Modifikation und die Löslichkeit in Alkalien gäbe eine befriedigende Erklärung für die von *Doerr* gefundene Tatsache, daß das Dysenteriegift durch Einwirkung von Säuren unwirksam wird und daß diese Veränderung durch Basen rückgängig gemacht werden kann. Damit steht aber

die Angabe in Widerspruch, daß die saure Modifikation „hervorragend" immunisierend wirkte; soweit das bisher bekannt ist, vermögen nur wasserlösliche Körper im Organismus immunisatorische Leistungen zu entwickeln, und wasserunlösliche Stoffe, wie etwa Lipoide, binden höchstens in vitro Antikörper, besitzen also lediglich den Charakter von „Haptenen" im Sinne *Landsteiners*. *Fränkel* scheint dagegen größeres Gewicht auf das Metallion (Alkaliion) zu legen, dessen Fehlen im Toxinmolekül Ungiftigkeit, dessen Vorhandensein Toxizität bedingen soll, da er ausdrücklich sagt: „Erst die Anwesenheit von Metallion (Alkaliion) macht das *Atoxin* zum *Toxin*. Es gehören also zweierlei Dinge zum Zustandekommen der Toxizität, für den antigenen Charakter genügt aber die saure organische Komponente." Damit wird aber das Metallion, genauer das Natriumion zum Träger der Giftwirkung, und zwar der *spezifischen Giftwirkung des Dysenterietoxins* gestempelt, was an sich höchst unwahrscheinlich und auch deshalb unmöglich ist, weil man ja die *verschiedensten* Toxine durch Säuren inaktivieren und durch Sodalösung resp. Natronlauge reaktivieren kann; obwohl immer das gleiche Natriumion in Aktion tritt, ist die Giftwirkung des regenerierten Toxins doch jedesmal eine andere und entspricht jener der gewählten d. h. zum Versuche verwendeten Ausgangslösung (*Doerr*). Aus den Versuchen von *Doerr* hatte sich übrigens mit absoluter Sicherheit ergeben, daß für die Inaktivierung einer Toxinlösung die Natur des Säureanions ebenso gleichgültig ist wie für die folgende Reaktivierung die besonderen Eigenschaften des Kations der Base. Es war daher a priori klar, daß für den erstgenannten Vorgang nur die Wasserstoffionen und ihre Konzentration, für den zweitgenannten lediglich die reaktionsfähigen Hydroxylionen maßgebend sein können und daß hier der Hebel anzusetzen ist, um das von *Doerr* beschriebene Phänomen zu analysieren.

Auf Anregung von Prof. *Doerr* unternahm ich es, das vorstehend umgrenzte Thema erneut zu bearbeiten. Die (größere Tieropfer erfordernden) Untersuchungen konnten zwar bisher noch nicht zum Abschlusse gebracht werden, haben indes in mehrfacher Hinsicht bedeutungsvolle Resultate zutage gefördert, so daß eine erste Mitteilung über den derzeitigen Stand der erzielten Ergebnisse durchaus gerechtfertigt erschien.

I. Inaktivierung eines Dysenterietoxins (Bouillonkulturfiltrates) durch Salzsäure; Reaktivierung durch Natronlauge. — Immunisatorische Eigenschaften der sauren und der wieder alkalisierten Toxinlösung.

Zunächst soll ein Beispiel für das zu untersuchende Phänomen angeführt werden, welches nicht nur über die Versuchsanordnung im allgemeinen unterrichtet, sondern in vielen Punkten Schlüsse gestattet, die über die seinerzeit von *Doerr* abgeleiteten Folgerungen hinausgehen und dieselben in einzelnen Punkten auch korrigieren.

Das verwendete Toxin „Toba I" war ein Bouillonkulturfiltrat und besaß eine primäre Toxizität, die aus der nachstehenden Titration zu entnehmen ist.

Kaninchen D 78, 1600 g, 0,25 ccm intravenös. † in 2 Tagen; Sektionsbefund: Cöcalödem, ausgedehnte Hämorrhagien der Blinddarmschleimhaut.

Kaninchen D 77, 1550 g, 0,1 ccm. † in 24 Stunden; negativer autoptischer Befund.

Kaninchen D 76, 1500 g, 0,05 ccm. Symptomlos.

Von diesem Toxin wurden 18 ccm mit 2 ccm n-HCl versetzt und die Mischung 24 Stunden bei Zimmertemperatur (zirka 20° C) gehalten. Es sei besonders betont, daß die Toxinbouillon nach dem Zusatz der Säure völlig klar war und daß sich auch beim Stehen in derselben keine Spur einer Ausflockung zeigte, wie man erwarten müßte, wenn die Auffassung von *Fränkel* über die Natur der sauren, ungiftigen Toxinmodifikation (des hypothetischen „Atoxins") richtig wäre. Nichtsdestoweniger erwies sich das Toxinsäuregemisch, welches als solches (also ohne vorherige Neutralisation!) intravenös injiziert wurde, in allen geprüften Dosen als ungiftig:

Kaninchen	TO 13 . . .	1450 g	0,10 ccm (berechnet auf die Ausgangsbouillon)	Symptomlos
„	TO 14 . . .	1450 g	0,25 ccm	„
„	TO 15 . . .	1600 g	0,50 ccm	„
„	TO 16 . . .	1520 g	1,00 ccm	„
„	TO 17 . . .	1620 g	2,00 ccm	„
„	TO 18 . . .	1550 g	2,00 ccm	„
„	TO 26 . . .	1450 g	5,00 ccm	„

Selbst die 50fache Dosis letalis des ursprünglichen Toxins rief also nach der Ansäuerung keinerlei Erscheinungen hervor; nicht einmal vorübergehende Paresen waren zu beobachten. Nun wurden 10 ccm des sauren Gemisches *mit der äquivalenten Menge Natronlauge (1 ccm n-NaOH) versetzt* und nach 4stündigem Stehenlassen steigende Volumina der neutralisierten Toxinbouillon intravenös eingespritzt:

Kaninchen	TO 19 . . .	1500 g	0,10 ccm	nach 5 Tagen *Paraparesis posterior;* erholt sich und überlebt.
„	TO 20 . . .	1550 g	0,25 ccm	† in 6 Tagen; starkes Cöcalödem.
„	TO 21 . . .	1490 g	0,50 ccm	† in 4 Tagen; Cöcalödem.
„	TO 22 . . .	1470 g	1,00 ccm	† in 2 Tagen; schwaches submukös. Cöcalödem.
„	TO 23 . . .	1450 g	2,00 ccm	† in 2 Tagen; negativ. Sektionsbef.

Die Toxizität wurde somit fast vollständig wiederhergestellt; daß TO 19, welches 0,1 ccm erhalten hatte, nicht einging, sondern im Gegensatz zu dem korrespondierenden, mit nativem Toxin gespritzten Kaninchen D_{77} überlebte, hat wenig zu bedeuten, da 0,1 ccm auch für das native Toxin die Grenzdosis repräsentierte und da sich überdies auch bei TO_{19} Lähmungen gezeigt hatten. Auffallend war nur die erhebliche Verlängerung der Inkubation, welche fast bei allen mit neutralisiertem Toxin injizierten Kaninchen beobachtet werden konnte und bei TO_{19} bis TO_{20} besonders ausgeprägt in Erscheinung trat. Die Regeneration der ursprünglichen Giftigkeit hatte sich vollzogen, nachdem die zugesetzte Säuremenge durch ein *äquivalentes* Quantum NaOH genau neu-

tralisiert worden war; ein Überschuß an Alkali, den *Doerr* noch für notwendig hielt, ist, wie man erkennt, überflüssig, ja, wie später bewiesen werden soll, schädlich.

Sämtliche Kaninchen, welche den Versuch genügend lange überlebten, wurden nach Ablauf von 30 Tagen zwecks Prüfung auf das Vorhandensein einer aktiv antitoxischen Immunität mit je 0,5 ccm eines anderen Bouillonkulturfiltrates „Toba VII" intravenös reinjiziert; das Gift, welches auch für alle anderen Immunitätsproben, und zwar in der gleichen Dosis und nach dem konstant gehaltenen Intervall von 30 Tagen benutzt wurde, wirkte in der Menge von 0,25 ccm noch sicher, in Dosen von 0,1 ccm nicht mehr ganz regelmäßig tödlich:

Kaninchen	TO 70 . . .	1650 g	0,50 ccm	† in 4 Tagen.
„	TO 71 . . .	1600 g	0,50 ccm	† in 2 Tagen; starkes Cöcalödem.
„	BA 48 . . .	1650 g	0,25 ccm	† in 4 Tagen.
„	TO 64 . . .	1500 g	0,25 ccm	† in 2 Tagen.
„	TO 65 . . .	1580 g	0,10 ccm	† in 2 Tagen; mäßiges Cöcalödem.
„	TO 66 . . .	1600 g	0,10 ccm	Paresen, überlebt.

Die Prüfungsdosis 0,5 ccm war somit doppelt so groß wie die Dosis certe letalis und wenigstens fünfmal so groß wie die Dosis letalis minima.

Als immun erwiesen sich nur:

Kaninchen D 76, *welches mit 0,05 ccm nativen Toxins*, und
„ TO 19, *das mit 0,1 ccm angesäuerten, aber wieder neutralisierten Toxins vorbehandelt worden war.*

Beide Tiere vertrugen 0,5 ccm Toba VII intravenös ohne Erscheinungen zu zeigen und blieben noch durch Wochen am Leben. *Hingegen verendeten alle Kaninchen ohne Ausnahme, die 30 Tage vorher angesäuertes Toxin erhalten hatten,* wie folgende Tabelle lehrt:

TO 13	0,5 ccm	Toba VII	† in 3 Tagen, vorher Lähmungen; sulziges Cöcalödem, Hämorrhagien der Blinddarmschleimhaut.
TO 14	0,5 ccm	„	† in 2 Tagen; ausgedehnte Nekrosen und Blutungen der Cöcalschleimhaut.
TO 15	0,5 ccm	„	† in 2 Tagen; geringes Ödem.
TO 16	0,5 ccm	„	† in 3 Tagen; vorher Paralysen.
TO 17	0,5 ccm	„	† in 3 Tagen; vorher Paralysen.
TO 26	0,5 ccm	„	† in 3 Tagen; vorher Paralysen.

Überblickt man den ganzen Versuchsverlauf, so ergeben sich aus demselben folgende, unmittelbar ableitbare Konsequenzen:

1. Toxische Filtrate der Bouillonkulturen von Shiga-Bacillen lassen sich anscheinend völlig entgiften, wenn man pro Kubikzentimeter der Giftbouillon 0,1 ccm n-HCl zusetzt; es wirken weder kleine noch große Dosen der angesäuerten Toxinlösung, woraus man schließen darf, daß das Quantum der den Kaninchen einverleibten Säure für das Ausbleiben des toxischen Effektes nicht verantwortlich gemacht werden kann.

2. Die Entgiftung der Toxinlösung kann nicht darauf beruhen, daß das Toxin bei saurer Reaktion in eine unlösliche Modifikation übergeführt wird; der Säurezusatz erzeugt in der Giftbouillon keine wahrnehmbare Flockung oder Fällung.

3. Gleichzeitig mit der Toxizität schwindet auch die Antigenfunktion, da die mit Säure-Toxin-Gemischen vorbehandelten Kaninchen keine aktive antitoxische Immunität erwerben. Ausnahmen von diesem Gesetz sind nur scheinbar und werden dadurch bedingt, daß nicht das ganze im Reaktionsvolum vorhandene Toxinquantum in die atoxische Modifikation umgesetzt wird, sondern daß ein Teil des Toxins als solches erhalten bleibt und im Tierkörper zur Auswirkung gelangt. Solche Ausnahmen sollen später durch besondere Versuchsbeispiele belegt und erörtert werden.

4. Exakte Neutralisation der Säure durch äquivalente Mengen Natronlauge bringen die Toxizität wieder zum Vorschein, und zwar in bestimmten Fällen (wozu eben das beschriebene Experiment gehört) annähernd quantitativ. Das regenerierte Toxin wirkt ebenso wie das native auf das Nervensystem (Paraparesen und Paraplegien) *und* auf den Blinddarm (subseröses und submuköses Ödem, Hämorrhagien und Nekrosen des Coecums); Anhaltspunkte für die Existenz besonderer Neuro- und Enterotoxine konnten also in diesen Versuchen nicht gewonnen werden. Dementsprechend rief auch das angesäuerte (nicht regenerierte) Toxin nicht nur keinerlei nervöse Symptome hervor, sondern vermochte auch den Darm nicht anzugreifen, indem sich bei keinem der mit Toxin-Säure-Gemisch injizierten Tiere Diarrhöen beobachten ließen; in der Folge wurden übrigens solche Kaninchen 2 bis 5 Tage nach der Injektion der sauren Toxinlösungen getötet und die Abwesenheit anatomischer Veränderungen im Darme direkt festgestellt.

5. Mit der regenerierten Toxizität stellte sich auch das antigene Vermögen wieder ein, *so daß man zwar nicht von der Darstellung bzw. Synthese eines Antigens, wohl aber von der Umwandlung eines nichtantigenen in einen antigenen Körper sprechen darf.* Da sich diese Aussage, soweit der vorstehende Versuch in Betracht kommt, nur auf das Verhalten weniger Tiere gründet, wurde die immunisierende Wirkung nativer, angesäuerter und regenerierter (wieder neutralisierter) Toxine noch wiederholt in vergleichenden Reihenversuchen geprüft; das Ergebnis war im Prinzip das gleiche, wie das nachstehende, besonders instruktive Paradigma lehrt:

Ein Bouillonkulturfiltrat („Toxin γ“) war so toxisch, daß 0,025 ccm ein Kaninchen von ca. 1500 g innerhalb von 2 Tagen zu töten vermochten:

Kaninchen	TO 92 . . .	1360 g	0,25 ccm i. v.	† in 18 St.; leicht. Cöcalödem
„	TO 91 . . .	1400 g	0,10 ccm i. v.	† in 2 Tagen; Ödem.
„	TO 90 . . .	1320 g	0,05 ccm i. v.	† in 2 Tagen; Cöcalödem und Hämorrhagien.

Kaninchen	BA 17 . . .	1660 g	0,025 ccm i. v.	† in 2 Tag.; mäß. Cöcalödem.
„	BA 16 . . .	1590 g	0,01 ccm i. v.	Symptomlos.
„	BA 15 . . .	1540 g	0,005 ccm i. v.	„

8 ccm dieser Giftbouillon wurden (aus Gründen, die für die hier diskutierte Frage irrelevant sind) mit 24 ccm gewöhnlicher Nährbouillon versetzt und dadurch auf das 4fache verdünnt; die Dosis letalis mußte daher auf 0,1 ccm ansteigen, was auch de facto der Fall war, wie eine besondere Titrationsreihe ergab.

Zu 18 ccm dieser Verdünnung (= 4,5 ccm Toxin γ) wurden nun 2 ccm n-HCl zugefügt und das Gemisch nach 48stündigem Stehen in steigenden Dosen Kaninchen intravenös injiziert:

Kaninchen	TA 6 . . .	1350 g	0,025 ccm i. v.[1])	Symptomlos
„	TA 7 . . .	1400 g	0,050 ccm i. v.	„
„	TA 8 . . .	1450 g	0,100 ccm i. v.	„
„	TA 9 . . .	1450 g	0,250 ccm i. v.	„
„	TA 10 . .	1550 g	0,500 ccm i. v.	„
„	TA 11 . .	1600 g	1,000 ccm i. v.	„

Selbst das 40fache Multiplum der Dosis letalis des nativen Toxins war nunmehr wirkungslos.

Nun wurde die Säure wieder neutralisiert oder richtiger schwach überneutralisiert, indem zu 10 ccm der sauren Giftbouillon 1,1 ccm n-NaOH kamen; nach 2stündigem Stehen ergab die Auswertung der Toxizität zwar keine vollständige, aber doch eine deutliche Regeneration der ursprünglich vorhandenen Giftwirkung:

Kaninchen	TA 12 . .	1350 g	0,025 ccm i. v.[1])	Symptomlos
„	TA 13 . .	1400 g	0,050 ccm i. v.	„
„	TA 14 . .	1450 g	0,100 ccm i. v.	„
„	TA 15 . .	1500 g	0,250 ccm i. v.	„
„	TA 16 . .	1550 g	0,500 ccm i. v.	† in 3 Tagen; leichtes Cöcalöd.

Nach Ablauf von 30 Tagen erhielten sämtliche Tiere, welche die Injektion genügend lange überlebt hatten, 0,5 ccm „Toba VII" (die für alle Immunitätsprüfungen verwendete Einheitsdosis) intravenös. Das Resultat war außerordentlich markant:

a) mit nativem Gift vorbehandelte Kaninchen:

BA 15. . . .	0,5 ccm	Toxin VII i. v.	Symptomlos.
BA 16 . . .	0,5 ccm	„ VII i. v.	„

b) mit „saurem" Gift vorbehandelte Kaninchen:

TA 6	0,5 ccm	Toxin VII i. v.	† in 2 Tagen.
TA 7	0,5 ccm	„ VII i. v.	† in 2 Tagen.
TA 8	0,5 ccm	„ VII i. v.	† in 3 Tagen; Cöcalödem.
TA 9	0,5 ccm	„ VII i. v.	† in 2 Tagen.
TA 10. . . .	0,5 ccm	„ VII i. v.	† in 2 Tagen; Ödem, Blutungen im Coecum.
TA 11. . . .	0,5 ccm	„ VII i. v.	† in 3 Tagen; Ödem, ausgedehnte Blutungen, Nekrosen im Coecum.

c) mit angesäuerter und wieder alkalisierter Giftlösung vorbehandelte Tiere:

TA 12. . . .	0,5 ccm	Toxin VII i. v.	Symptomlos.
TA 14. . . .	0,5 ccm	„ VII i. v.	„
TA 15. . . .	0,5 ccm	„ VII i. v.	„

[1]) Der Übersichtlichkeit halber sind in sämtlichen Tabellen nicht die injizierten Quantitäten der Reaktionsgemische, sondern die in denselben rechnungsgemäß enthaltenen Mengen der zum Versuche jeweils verwendeten Giftbouillon angegeben.

Nur subletale Dosen des nativen und des regenerierten Toxins hatten somit aktive antitoxische Immunität hervorzurufen vermocht. Bedauerlich ist, daß es verabsäumt worden war, *die Dosis immunisans minima* des nativen und des regenerierten Giftes exakt festzustellen; als die Bedeutung dieser Auswertungen evident wurde, war der gesamte Toxinvorrat bereits für anderweitige Zwecke verbraucht worden, so daß ganz sichere Angaben über die durch Säuerung und durch nachfolgende Neutralisierung hervorgerufenen Änderungen der Antigenfunktionen des Ausgangsgiftes nicht mehr möglich erscheinen. Immerhin darf behauptet werden, daß in 1,0 ccm der sauren Giftlösung entweder gar kein unverändertes Toxin oder doch nur eine Menge enthalten sein konnte, die jedenfalls kleiner war als der Toxingehalt von 0,005 ccm der nativen Giftbouillon. Auch vermag man leicht einzusehen, daß der Widerspruch zwischen der relativ geringen Toxizität und der weit stärkeren immunisierenden Wirkung des regenerierten Giftes nur ein scheinbarer sein kann und keineswegs zu der Annahme nötigt, daß sich bei der Regeneration besondere ungiftige, aber mit Antigenfunktion ausgestattete Giftderivate im Sinne der *Fränkel*schen „Atoxine" bilden; dieser Schluß wäre nur gerechtfertigt, wenn man nachweisen würde, daß die Toxizität nicht im gleichen quantitativen Ausmaße wiederhergestellt wird wie das immunisierende Vermögen, ein Nachweis, der eben im vorliegenden Falle — wie betont — nicht erbracht wurde. Vorderhand deutet alles darauf hin, daß der Einfluß der Säure sowohl wie die nachfolgende Neutralisierung die beiden physiologisch wichtigen Gruppen des Toxinmoleküls, die „toxophore" und die „haptophore", ganz gleichsinnig affizieren und daß hier somit nichts von der Unabhängigkeit der Träger der beiden Funktionen zu bemerken ist, die man bei anderen chemischen Eingriffen (Jodtrichlorid, Formaldehyd usw.) so häufig zu beobachten in der Lage ist.

II. Irreversibilität anderer durch chemische Agenzien bewirkter Veränderungen bakterieller Toxine.

Die Sonderstellung der Toxin-Säure-Reaktion prägt sich auch dadurch aus, daß sie, soweit bisher bekannt, die einzige Toxinmodifikation liefert, die wieder in das native Toxin, d. h. in einen Körper mit den biologischen Leistungsqualitäten desselben rückverwandelt werden kann. Eigene Versuche, die unternommen wurden, um andere Toxinreaktionen ausfindig zu machen, welche nach dem Typus der Toxin-Säure-Reaktion verlaufen und zur Entstehung ungiftiger, nicht antigener, aber reversibler Produkte führen, verliefen vollständig ergebnislos.

Vor allem war es nicht möglich, Dysenterie- oder Diphtherietoxine, welche durch primäre Einwirkung von Laugen ihrer Toxizität und ihrer aktiv immunisierenden Wirkungen beraubt worden waren, durch Her-

stellung der Ausgangsreaktion (Neutralisation mit Salzsäure) wieder zu regenerieren, also die Reihenfolge Säure-Lauge in der ursprünglichen Versuchsanordnung von *Doerr* umzukehren.

a) 18 ccm eines Diphtherietoxins (Dosis letalis für Meerschweinchen von 250 g Körpergewicht = 0,004 ccm) wurden mit 2 ccm n-NaOH versetzt und 15 St. bei 37° im Wasserbade gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit war die Giftigkeit vollständig geschwunden; Mengen des Reaktionsgemisches, welche 0,24 ccm des Ausgangsgiftes enthielten (gleich dem 60fachen Multiplum der Dosis letalis) riefen, subcutan injiziert, nicht einmal lokale Veränderungen (Infiltrate) hervor.

10 ccm dieses alkalisierten Toxins mit der äquivalenten Menge Säure (1 ccm n-HCl) versetzt und 2 Stunden bei 20° gehalten, erwiesen sich ebenfalls als vollkommen atoxisch, wenigstens in dem Bereiche, das der 1—60fachen tödlichen Dosis des nativen Giftes entsprach.

b) 18 ccm des bereits erwähnten Dysenterietoxins „γ" (Dosis letalis für Kaninchen von 1500 g = 0,025 ccm intravenös) mit 2 ccm n-NaOH versetzt und 16 Stunden im Wasserbade von 37° gehalten, lieferten ein nur mehr in sehr hohen Dosen toxisches Gemenge:

Kaninchen	BA 76	1400 g	0,10 ccm i. v.	Symptomlos.
„	BA 77	1450 g	0,50 ccm i. v.	„
„	BA 78	1450 g	1,00 ccm i. v.	„
„	BA 79	1500 g	2,00 ccm i. v.	„
„	BA 80	1500 g	5,00 ccm i. v.	† in 3 Tagen.

10 ccm des alkalisierten Toxins plus 1 ccm n-HCl, 2 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten, wirkten nicht giftiger, zeigten also keine Andeutung der Regeneration des Toxins mit seinen originären Eigenschaftes:

Kaninchen	BA 81	1400 g	0,10 ccm i. v.	Symptomlos.
„	BA 82	1400 g	0,25 ccm i. v.	„
„	BA 83	1450 g	0,50 ccm i. v.	„
„	BA 84	1450 g	1,00 ccm i. v.	„
„	BA 85	1500 g	2,00 ccm i. v.	verspäteter Exitus nach einem symptomlosen Intervall von 7 Tagen; negativer Sektionsbefund.

Da in beiden Serien mehrere Kaninchen vor dem Ablauf des 30.Tages eingingen, ergab die Immunitätsprobe (0,5 ccm „Toba VII" intravenös) kein vollständiges Bild. BA_{76}, BA_{78} und BA_{79} der ersten Serie erwiesen sich indes als nicht immun, da sie sämtlich innerhalb von 4 Tagen zum Teil mit charakteristischem anatomischen Befund am Coecum verendeten. Man kann somit sagen, daß:

1. Dysenterie- und Diphtherietoxin infolge der Einwirkung relativ niedriger Hydroxylionenkonzentrationen die spezifische Giftigkeit und mit ihr die Antigenfunktion (die aktiv immunisierende Wirkung) einbüßen, und

2. daß diese Veränderungen durch Neutralisation der zugesetzten Basen nicht wieder rückgängig gemacht werden können.

Die hiermit nachgewiesene Deteriorierung der Bakterientoxine durch Alkalien macht es auch verständlich, warum man bei der Regeneration „saurer" Toxine durch Abstumpfung der Säure (Versuchsanordnung

von *Doerr*) gewisse Kautelen einzuhalten hat. Es empfiehlt sich jedenfalls, nur die dem verwendeten Säurequantum äquivalente Menge Natronlauge zuzusetzen und einen Überschuß von Alkali zu vermeiden, speziell wenn man die Gemische nicht sofort nach der Neutralisierung auf ihre Giftigkeit prüft, sondern erst nach längerem Stehen; andernfalls kann es geschehen, daß die erwartete „Regeneration" im Versuche nicht zum Ausdruck kommt oder gar scheinbar ins Gegenteil umschlägt. Folgendes Experiment läßt diese Verhältnisse sehr deutlich hervortreten:

45 ccm Dysenterietoxin („Toba I"; Dosis letalis = 0,1 ccm i. v. für Kaninchen von 1500 g) werden mit 5 ccm n-HCl versetzt und das saure Gemisch 20 Std. bei 37° gehalten; es ist auch in Mengen von 5,5 ccm (= 5,0 ccm Ausgangslösung) für Kaninchen unschädlich. Nun werden 3 Portionen des „sauren", unwirksamen Toxins von je 9,0 ccm in 3 Eprouvetten abgefüllt und zur 1. 1 ccm, zur 2. 2 ccm, zur 3. 3 ccm n-NaOH zugefügt. In der 1. Eprouvette war somit die Säure ganz schwach, in der 2. mäßig, in der 3. stark überneutralisiert. Die Toxizitätsprüfung ergab 2 Stunden nach dem Zusatz der Lauge:

a) 1. Eprouvette (9 ccm saures Toxin + 1 ccm n-NaOH):

Kaninchen	TO 27	1550 g	0,25 ccm i. v.	Symptomlos.
„	TO 28	1400 g	0,50 ccm i. v.	„
„	TO 29	1450 g	1,00 ccm i. v.	† in 24 Stunden; Darmblutung.
„	TO 30	1650 g	2,00 ccm i. v.	† in 2 Tagen.

b) 2. Eprouvette (9 ccm saures Toxin + 2 ccm n-NaOH):

Kaninchen	TO 31	1370 g	0,25 ccm i. v.	Symptomlos
„	TO 32	1300 g	0,50 ccm i. v.	„
„	TO 33	1450 g	1,00 ccm i. v.	„
„	TO 34	1500 g	2,00 ccm i. v.	„

c) 3. Eprouvette (9 ccm saures Toxin + 3 ccm n-NaOH):

Kaninchen	TO 35	1350 g	0,25 ccm i. v.	Symptomlos.
„	TO 36	1500 g	0,50 ccm i. v.	„
„	TO 37	1550 g	1,00 ccm i. v.	„
„	TO 38	1500 g	2,00 ccm i. v.	„

Nur am ersten Gemisch war somit die Wiederkehr der durch den Säurezusatz verlorenen Toxizität zu konstatieren, und zweifellos wäre auch hier der Effekt ein besserer gewesen, wenn man nicht mehr Alkali als zur Neutralisierung der Säure nötig war (1,0 statt 0,9 ccm n-NaOH) verwendet haben würde; denn ein zweiter, *mit äquivalenten Mengen* ausgeführter Versuch, der bereits im ersten Kapitel ausführlich reproduziert wurde und bei dem dasselbe Gift benutzt worden war, hatte eine fast vollständige Wiederherstellung der Toxizität ergeben, während das schwach überneutralisierte Gemenge in der ersten Eprouvette nur mehr 10% des ursprünglich vorhandenen Toxins in nachweisbarer Form enthielt.

Sehr typisch und ganz im Sinne der bisherigen Ausführungen verliefen auch die *Immunitätsproben*, die nach Ablauf von 30 Tagen an den überlebenden Tieren angestellt werden konnten (0,5 ccm „Toba VII" intravenös):

Es erwiesen sich als *nicht immun:* sämtliche mit *saurem,* mit *mäßig* und mit *stark überneutralisiertem* Toxin vorbehandelten Kaninchen; *immun* waren nur Kaninchen, die subletale Dosen nativen oder schwach überneutralisierten Toxins (9 ccm saures Toxin + 1 ccm n-NaOH) erhalten hatten.

Die Alkalien (Hydroxylionen) vernichten also nicht nur die Toxizität, sondern auch die Antigenfunktion und verhalten sich gegenüber den Toxinen in letzterer Beziehung ganz ähnlich wie gegenüber den hochmolekularen Eiweißkörpern (Ovalbumin, Zein, Gliadin, Casein usw.).

Beiläufig sei auch erwähnt, daß verschiedentliche Versuche gemacht wurden, die *Formolderivate der Toxine,* die zuerst von *Löwenstein* und *Eisler* beschrieben und in neuerer Zeit von *Ramon* praktisch zur aktiven antitoxischen Immunisierung von Menschen gegen Diphtherie herangezogen wurden, in die Ausgangsform zu revertieren. Bekanntlich sind diese Formolderivate atoxisch wie die sauren Toxinabkömmlinge, besitzen aber zum Unterschiede von letzteren wohl entwickelte Antigenfunktionen; die Regeneration könnte sich hier nur auf die Toxizität erstrecken, eine Aufgabe, die auf den ersten Blick leichter erscheint als die Regeneration von Giftigkeit *und* verschwundener antigener Leistung. Ohne auf Einzelheiten dieser noch nicht abgeschlossenen Arbeiten einzugehen, sei nur kurz hervorgehoben, daß es bisher nicht möglich war, partiell oder (soweit nachweisbar) total entgiftete Formoltoxine wieder stark toxisch zu machen.

III. Die den Ablauf der Toxinsäurereaktion bestimmenden Faktoren.

Die Tatsache (welche schon *Doerr* feststellte und die wir in den vorliegenden Untersuchungen bestätigen konnten), daß die durch Mineralsäuren bewirkte Umsetzung der bakteriellen Toxine in ungiftige, reversible Produkte nicht unter allen Umständen restlos abläuft, sondern derart vor sich geht, daß bei Einhaltung bestimmter Bedingungen neben den eben genannten Derivaten auch noch unverändertes Toxin nachgewiesen werden kann, besitzt doppelte Bedeutung. Sie gestattet zunächst den Schluß, daß der Transformationsprozeß nicht darin bestehen kann, daß das Toxin bei saurer Reaktion in einen unlöslichen (und deshalb unwirksamen) Zustand übergeführt wird, sei es nun auf Grund chemischer Vorgänge oder infolge einer rein physikalisch bedingten Verminderung des Dispersitätsgrades; sie legt vielmehr die Vermutung nahe, daß sich Toxin und Säure im Sinne einer unvollständig ablaufenden, einem Gleichgewichtszustand zustrebenden Reaktion beeinflussen, deren Endeffekt (die Entstehung der atoxischen, nichtantigenen, reversiblen Abkömmlinge) nicht auf der Änderung der physikalischen Eigenschaften, sondern auf einer Änderung der chemischen Konstitution des Toxinmoleküls beruht. Zweitens aber gibt uns die Unvollständigkeit und der allmähliche Verlauf der Reaktion ein Mittel in die Hand,

um ihre Abhängigkeit von den verschiedenen, an der Versuchsanordnung beteiligten Faktoren messend zu verfolgen. Was in dieser Hinsicht ermittelt werden konnte, soll in diesem Kapitel auseinandergesetzt werden.

a) Die Reaktion als Funktion der Zeit.

Ein Diphtherietoxin (Bouillonkulturfiltrat) erwies sich als so toxisch, daß 0,004 ccm subcutan injiziert ein Meerschweinchen innerhalb von 4 Tagen gerade zu töten vermochten.

Von diesem Gifte wurden 13,5 ccm im Wasserbade auf 37° vorgewärmt und mit 1,5 ccm ebenfalls vorgewärmter $^{0,81}/_{n}$-HCl versetzt: Das Gemenge blieb im Wasserbade stehen. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und ihre Giftigkeit in ziemlich genauen Reihenversuchen an Meerschweinchen von 250 g durch subcutane Injektion steigender Dosen austitriert. Die notwendigen Verdünnungen erfolgten mit kalter physiologischer (0,85%) NaCl-Lösung: injiziert wurde sofort nach Herstellung der Dilutionen und das Injektionsvolum konstant mit 1,0 ccm Flüssigkeit bemessen. Das sukzessive Anwachsen der Dosis letalis minima ist aus folgender Tabelle zu ersehen:

Dauer der Säurewirkung:	Dosis letalis minima:
Null	0,004 ccm
30 Sekunden	$\leqslant$ 0,024 ccm
30 Minuten	$\leqslant$ 0,048 ccm
3 Stunden	= 0,096 ccm
8 „	= 0,192 ccm

Da die Bestimmungen trotz des großen Tieraufwandes noch immer zu ungenau und lückenhaft waren, müssen wir vorderhand darauf verzichten, den Vorgang in Form einer Kurve oder einer Gleichung darzustellen; auch kann derzeit nicht bestimmt gesagt werden, ob sich verschiedene Lösungen (Bouillonkulturfiltrate) des gleichen Toxins oder gar Toxine verschiedener Art identisch bzw. analog verhalten. Das obige Experiment wurde nur in einer Richtung ergänzt. Die Abnahme der Giftigkeit beweist an sich natürlich nicht, daß das in derselben zum Ausdrucke gelangende Toxinmanko zur Gänze auf die Umsetzung in das atoxische, reversible Derivat zurückzuführen ist; es könnten ja auch atoxische, aber irreversible Spaltprodukte des Giftes gebildet worden sein. Es wurde daher eine gleiche Menge desselben Toxins in der nämlichen Weise angesäuert und nach 30 Min. sowie nach 8 Stunden je eine Probe entnommen, mit der äquivalenten Menge n-NaOH ($^{0,81}/_{n}$) neutralisiert und die Giftigkeit nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur neuerlich titriert:

Dauer der Säurewirkung:	Dosis letalis minima nach der Regeneration:
30 Minuten	0,006 ccm
8 Stunden	0,006 ccm

Die Regeneration war somit bei beiden Proben eine fast vollständige und vor allem auch eine gleich intensive, woraus die Folgerung ab-

geleitet werden darf, daß in den ersten 8 Stunden *der hier beschriebenen Reaktion* das native Toxin so gut wie vollständig in die atoxische, reversible Modifikation umgesetzt wurde und daß zur Zeit $t_1 = 30$ Min. viermal weniger von diesem Körper vorhanden war als zur Zeit $t_2 = 8$ Stunden.

b) Die Reaktion als Funktion der Säure-(Wasserstoffionen-)Konzentration.

α) Diphtherietoxin.

Die Dosis letalis minima des Ausgangsgiftes betrug 0,004 ccm (subcutane Injektion, Meerschweinchen von 250 g, Exitus innerhalb von 4 Tagen).

3 Portionen des Giftes von je 4,5 ccm wurden mit je 0,5 ccm steigender Salzsäurekonzentrationen versetzt und nach 20stündigem Verweilen im Wasserbade von 37° die Toxizität ausgewertet.

Säurekonzentration:	Dosis letalis minima nach 20 Std. bei 37°:
4,5 ccm Toxin + 0,5 ccm $^n/_{10}$-HCl	$>$ 0,004 ccm, $<$ 0,009 ccm
4,5 ccm „ + 0,5 ccm $^n/_{2,5}$-HCl	= 0,009 ccm
4,5 ccm „ + 0,5 ccm $^n/_1$-HCl	$>$ 0,048 ccm, $\leqslant$ 0,144 ccm

β) Dysenterietoxin („Toba I").

Die Dosis letalis belief sich auf 0,1 ccm intravenös für Kaninchen von 1500 g.

3 Proben von je 9 ccm, versetzt mit je 1,0 ccm steigender Säurekonzentration. Auswertung der Toxizität nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur:

Säurekonzentration:	Dosis letalis:
9,0 ccm Toxin + 1,0 ccm $^n/_{10}$-HCl	$>$ 0,10 ccm, $<$ 0,25 ccm
9,0 ccm „ + 1,0 ccm $^n/_{2,5}$-HCl	$>$ 0,25 ccm, $\leqslant$ 0,50 ccm
9,0 ccm „ + 1,0 ccm $^n/_3$-HCl	$>$ 5,0 ccm bzw. nicht bestimmbar.

Mit Rücksicht auf den Umstand, daß die giftigen Bouillonkulturfiltrate reichlich Puffersubstanzen enthalten, wurde der Wasserstoffexponent (p_H) des nativen Toxins und der angesäuerten Proben desselben, allerdings nur approximativ mit Hilfe colorimetrischer Methoden (amerikanische Farbstoffindicatoren) bestimmt. Ferner wurden einzelne der angesäuerten Proben mit äquivalenten Mengen n-NaOH versetzt und die Dosis letalis nach erfolgter Regeneration (2stündiges Stehenlassen der neutralisierten Gemenge) neuerlich ausgewertet. Die Zusammenstellung der Resultate lieferte folgendes Bild:

Natur der Lösung:	p_H	Dosis letalis minima vor der Regeneration:	nach
Natives Dysenteriegift	8,0	0,1 ccm	
9 ccm Toxin + 1,0 ccm $^n/_{10}$-HCl .	6,8	$>$ 0,10 ccm, $<$ 0,25 ccm	—
9 ccm „ + 1,0 ccm $^n/_{2,5}$-HCl .	4,0	$>$ 0,25 ccm, $\leqslant$ 0,50 ccm	0,10 ccm
9 ccm „ + 1,0 ccm $^n/_1$-HCl .	2,4	$>$ 5,0 ccm	0,25 ccm

Natürlich sind auch hier Ergänzungen unbedingt notwendig. Es läßt sich aber doch der Schluß ziehen, daß die Säure-Toxin-Reaktion bei niedrigeren H·-Konzentrationen nur sehr unvollständig oder höchstwahrscheinlich sehr langsam abrollt, und daß sie erst bei einem p_H von ca. 4,0—3,0 eine erhebliche Intensivierung bzw. Beschleunigung erfährt; ferner daß auch H·-Konzentrationen, die einem p_H von 2,4 entsprechen, das Toxin noch zum allergrößten Teile in die reversible Modifikation und nur in geringem Ausmaße in irreversibel ungiftige Verbindungen umsetzen, so daß die Reaktivierungsprozedur (falls eine bestimmte Reaktionsdauer und eine bestimmte Temperatur nicht überschritten werden) von gutem Erfolg begleitet ist. Werden die eben genannten H·-Konzentrationen noch weiter erhöht, etwa auf 1,5- 1,0 p_H, dann gelingt die Regeneration allerdings nicht mehr so gut und das wieder zum Vorschein gebrachte Toxinquantum beträgt nur mehr 5 bis 10% des in der Ausgangslösung vorhanden gewesenen. Genaue Angaben über *die optimale Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher eine maximale Ausbeute an atoxischen und reversiblen Giftderivaten erzielt wird*, können derzeit nicht gemacht werden, und zwar nicht einmal für ein bestimmtes Toxin, geschweige denn für alle Toxine, welche die in Rede stehende reversible Reaktion liefern. Die Schwierigkeiten, welche sich derartigen Ermittlungen in den Weg stellen, sind ungewöhnlich groß und sind hauptsächlich in dem Umstande begründet, daß man beim Experimentieren mit Bouillonkulturfiltraten nicht von reinen oder auch nur annähernd reinen Toxinlösungen ausgeht, sondern von Lösungen, die außer dem Toxin die verschiedensten Begleitsubstanzen führen, die mit der zugesetzten Säure sowohl wie mit der zur Regeneration benutzten Basen reagieren können. Es kommen da nicht nur diverse salzartige Stoffe, sondern auch nieder- und höhermolekulare Proteïde sowie aus dem Bakterienzerfall stammende antigene Stoffe in Betracht, so daß die Reaktion zwischen Säure und Toxin nur einen Partialprozeß bildet, der mit anderen simultan oder sukzedan verlaufenden chemischen Vorgängen eng verwoben ist und sich von denselben durch die experimentelle Analyse nicht mit hinreichender Schärfe abgrenzen läßt. Versuche mit reineren Toxinpräparaten sind im Gange und behalten wir uns vor, über dieselben seinerzeit Bericht zu erstatten.

c) Abhängigkeit der Reaktion von der besonderen Beschaffenheit der zum Versuche verwendeten Bouillonkulturfiltrate.

Bei der Prüfung des Verhaltens verschiedener Dysenteriebouillonkulturfiltrate fiel es auf, daß sowohl die Inaktivierung durch Säure als auch die Reaktivierung durch Alkalien nicht immer in der gleichen Weise abläuft, sondern daß beträchtliche Differenzen zu beobachten sind, und zwar auch dann, wenn man bestrebt ist, alle übrigen Versuchs-

bedingungen möglichst gleich zu gestalten. Man gewann den Eindruck, daß der Reaktionsausfall in irgendeiner Weise mit der Toxizität der benutzten Giftlösungen zusammenhängen müsse und daß sich diese Beziehung in der Existenz von drei, ziemlich gut charakterisierbaren Reaktionstypen ausdrückt:

1. Lösungen (Bouillonkulturfiltrate) von *hoher primärer Toxizität* behalten unter dem Einfluß einer Wasserstoffionenkonzentration, die dem p_H von ca. 2,5 entspricht, ihre Giftigkeit zum Teil bei; die Regeneration ist eine vollständige oder annähernd vollständige.

Das Dysenterietoxin „γ" z. B., dessen Dosis letalis nur *0,025 ccm* für Kaninchen von 1500 g betrug, verhielt sich beim Zusatz von 1 ccm $^{0,81}/_{n}$ HCl pro 9 ccm und 24stündigem Stehen des Gemisches bei 20° so, daß die Dosis letalis auf *0,5 ccm* anstieg; nach der Regeneration (äquivalente Menge NaOH, 2 Std. bei 37° C) wirkten wieder 0,025 ccm tödlich.

2. *Mittelstarke Gifte* verlieren im angesäuerten Zustande ihre Toxizität und ihr antigenes Vermögen anscheinend völlig; die Reaktivierung bringt beide Leistungsqualitäten wieder zum Vorschein, allerdings mit einem deutlich ausgeprägten Verlust. Hierher gehörte das Bouillonkulturfiltrat „Toba I".

3. *Schwache Gifte* werden durch Säuren unwirksam, lassen sich aber nicht mehr reaktivieren (Filtrat „Toba VIII").

Die folgende Tabelle illustriert diese Differenzen sehr gut; sie bezieht sich auf die drei vorstehend erwähnten Giftbouillonen, die sämtlich in identischer Weise mit Säure inaktiviert (9 ccm Gift plus 1 ccm $^{0,81}/_{n}$ HCl; 24stündiges Stehenlassen bei 20° C) und mit Alkali (äquivalente Menge NaOH; 2 Std. bei 20° C reaktiviert wurden:

Bezeichnung d. Giftlösung:	Dosis letalis minima des nativen,	des inaktivierten,	des reaktiv. Giftes:
I. „Toxin γ"	0,025 ccm	0,5 ccm	0,025 ccm
II. „Toba I".	0,100 ccm	nicht bestimmbar (> 5 ccm)	0,250 ccm
III. „Toba VIII" . . .	0,250 ccm	„ „ (> 5 ccm)	nicht bestimmbar

„Toba VIII" war im reaktivierten Zustände nicht nur ungiftig, sondern vermochte auch im Gegensatz zu den beiden anderen reaktivierten Toxinlösungen keine aktiv-antitoxische Immunität hervorzurufen.

Die erste Frage, die sich noch vor der Beurteilung dieser Resultate erhebt, ist selbstverständlich die, ob in allen drei Bouillonkulturfiltraten nach dem Zusatze der gleichen Salzsäuremengen auch eine identische $H^{\cdot}$-Konzentration herrschte, da diese ja, wie gezeigt wurde, den Reaktionsablauf entscheidend beeinflußt und bei Überschreitung einer bestimmten Grenze zur Bildung irreversibler atoxischer Toxinderivate führen kann. Nun belief sich der p_H nach dem Säurezusatze für

Toxin γ auf 2,39
Toba I auf 2,4
Toba VIII auf 1,64,

so daß man immerhin daran denken könnte, das besonders stark abweichende Verhalten von „Toba VIII" auf die höhere, in Aktion getretene H·-Konzentration zu beziehen. In den Versuchen mit „Toxin γ" und „Toba I" war aber die einwirkende H·-Konzentration dieselbe; trotzdem ließ sich eine, wenn auch geringere und mehr graduelle Differenz auch bei diesen beiden Giftbouillonen konstatieren, so daß es schon aus diesem Grunde nicht zulässig erscheint, die angewendete H·-Konzentration als den allein maßgebenden Faktor zu betrachten. Um volle Gewißheit in dieser Beziehung zu erhalten, wurden jedoch noch mehrfache Versuchsserien zu dem Zwecke angesetzt, um den Reaktionstypus der starken Toxine durch Änderung der Reaktionsbedingungen in jenen der schwachen Giftbouillonen umzuwandeln und umgekehrt; doch gelang es bisher auf diese Weise nicht, die Unterschiede zwischen den beiden Extremtypen völlig auszugleichen.

So wurde z. B. das kräftige „Toxin γ" einmal durch 24 Stunden bei 20° C einer H·-Konzentration von $p_H = 1{,}35$, ein anderes Mal einer H·-Konzentration, die dem p_H von 1,27 entsprach, exponiert. Toxizität und antigenes Vermögen schwanden zwar unter dem Einflusse der Säure fast vollständig; die Regenerationsfähigkeit blieb aber erhalten, indem sowohl die Toxizität als auch die immunisierende Wirkung nach der Abstufung der Säure wieder zum Vorschein kamen, die Toxizität allerdings nicht in dem Ausmaße, wie nach vorheriger Inaktivierung durch schwächere Säuregrade ($p_H = 2{,}39$). Da eines dieser Experimente schon im Kapitel 1 in extenso wiedergegeben wurde, genügt es, an dieser Stelle nur die Abschwächungen und Verstärkungen der Giftigkeit von „Toxin γ" bei verschiedenem p_H anzuführen:

Letale Dosis des nativen „Toxins γ":	Angewendeter Säuregrad:	Dosis letalis minima des angesäuerten,	des reaktivierten Giftes:
0,025 ccm	$p_H = 2{,}39$	0,5 ccm	0,025 ccm
	$p_H = 1{,}35$	nicht bestimmbar	0,500 ccm
	$p_H = 1{,}27$	„ „	0,250 ccm

Andererseits bemühten wir uns, die Regenerationsfähigkeit des schwachen Giftes „Toba VIII" dadurch zu konservieren, daß wir die Einwirkungsdauer der Säure ($p_H = 1{,}64$) von 24 auf 2 Stunden herabsetzten; Toxizität und Antigenfunktion wurden zwar auch in diesem Falle vollständig aufgehoben, aber der Zusatz von Alkali hatte keine deutliche Reaktivierung zur Folge. Wurde die Einwirkungsdauer der Säure unverändert gelassen, das Quantum der zugesetzten Säure dagegen erheblich reduziert (0,4 ccm $^{0{,}81}/_{n}$ HCl auf 9 ccm Toxin), so bestand der Effekt lediglich darin, daß das Toxin durch die Säure nicht mehr nachweisbar alteriert wurde, daß also native, angesäuerte und

wieder alkalisierte Giftbouillon ungefähr die gleiche Toxizität aufwiesen.

18 ccm Toxin „Toba VIII“ + 1,2 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + 0,8 ccm nHCl, 24 Stunden bei 20° stehengelassen, dann ausgewertet:

Kaninchen	BA 60	1420 g	0,50 ccm	† in 2 Tagen; Cöcalödem
„	BA 61	1500 g	1,00 ccm	† in 2 „ ; „
„	BA 62	1500 g	2,00 ccm	† in 24 Stunden; Cöcalödem.

10 ccm der angesäuerten Giftbouillon mit 0,4 /NaOH und 0,6 ccm NaCl-Lösung versetzt, wirkten nach 2stündigem Stehen bei 20° C:

Kaninchen	BA 63	1450 g	0,25 ccm	† in 3 Tagen.
„	BA 64	1450 g	0,50 ccm	† in 5 „
„	BA 65	1500 g	1,00 ccm	† in 28 Stunden; Cöcalödem.
„	BA 66	1500 g	2,00 ccm	† in 18 „ ; „

Die native Giftbouillon besaß folgende Toxizität:

Kaninchen	TO 73	1400 g	0,10 ccm	Symptomlos.
„	TO 74	1400 g	0,25 ccm	† in 2 Tagen.
„	TO 75	1420 g	0,25 ccm	† in 3 „
„	TO 76	1370 g	0,50 ccm	† in 3 „ ; Ödem und Nekrosen des Coecums.

Der Umstand, daß der Reaktionstypus der Giftbouillons mit dem Grade ihrer primären Toxizität in Konnex zu stehen schien, könnte ferner dazu verleiten, die Verschiedenheit des Reaktionsablaufes zur *Toxinkonzentration oder richtiger zu dem Verhältnis zwischen Toxin und Säure in Relation zu bringen*, etwa in dem Sinne, daß sich die beiden Stoffe direkt miteinander umsetzen und daß daher größere Gewichtsmengen Toxin auch größere Mengen Säure erfordern. Eine ähnliche Annahme muß wohl *S. Fränkel* vorgeschwebt haben, welcher aus den zur Reaktivierung der „sauren“, ungiftigen Modifikation des Dysenterietoxins notwendigen Quanten Sodalösung das Molekulargewicht derselben berechnen wollte. So einfach dürften indes die Dinge kaum liegen. Anhaltspunkte dafür, daß Toxinkonzentration und inaktivierendes Säurequantum gleichsinnig zu- oder abnahmen, lassen sich aus den eben beschriebenen Versuchen mit starken, mittelstarken und schwachen Toxinen nur in ziemlich vager Form ableiten; im einzelnen fehlt es nicht an Widersprüchen, indem z. B. Toxin „Toba VIII“, obwohl es zehnmal weniger toxisch war als „Toxin γ“, durch 40% des für das letztere ausreichenden Säurequantums nicht mehr inaktiviert wurde. Indes müßten hier wohl genauere Versuche in modifizierter Anordnung angestellt werden, um den Einfluß der in den Bouillonkulturfiltraten enthaltenen, mit Säuren reagierenden Begleitsubstanzen auszuschalten, was, wie eine einfache Überlegung lehrt, auch ohne „Reinigung“ der Toxine durchführbar ist. Wichtig erscheint aber schon jetzt, daß die Menge Toxin (als wägbare Substanz gedacht), die selbst in hochtoxischen Bouillonkulturfiltraten vorhanden sein kann, nach den gangbaren und gut begründeten Vorstellungen nur eine minimale ist und daß man die

Säure, falls eine Inaktivierung, d. h. eine Ausbeute an reversiblen Toxinderivaten erzielt werden soll, in beträchtlichem (im Verhältnis zum Toxingewicht vermutlich enormen) Überschuß zusetzen muß.

Da keine der beiden im vorstehenden erörterten Erklärungen mit den Versuchsergebnissen vollkommen harmoniert, muß schließlich noch die Möglichkeit ins Auge gefaßt werden, daß das, was wir als Dysenterietoxin zu bezeichnen gewöhnt sind, überhaupt kein einheitlicher Körper, kein chemisches Individuum ist, sondern daß sich im Laufe des Wachstums der Dysenteriebacillen (und vielleicht auch anderer toxischer Bakterien) in der Nährbouillon verschiedene Stoffe bilden, die in ihrem Aufbau voneinander abweichen, in ihrer physiologischen Auswirkung (spezifische Giftigkeit, Antigenfunktion) jedoch identisch oder sehr ähnlich sind, ein Ausweg, der die alte Vorstellung *Ehrlichs* von den „Toxinspektren" in geänderter Form und Bedeutung wieder aufleben ließe. Durch die Annahme einer Vielheit von Dysenterietoxinen lassen sich selbstverständlich alle Versuchsergebnisse erklären, wenn man jedem der hypothetischen Stoffe eine besondere Reaktionsfähigkeit (im chemischen Sinne) zuschreibt und je nach dem Resultat, welches das Experiment liefert, eine dazu passende Zusammensetzung der Ausgangs-Giftbouillon rückläufig konstruiert. Nur ist eben die Übereinstimmung zwischen Hypothese und Beobachtung eine gewollte, durch beliebige Permutation der hypothetischen Elemente erzielte (was ja auch für die Toxinspektren *Ehrlichs* zum Teil zutrifft) und keine gefundene. Im vorliegenden Falle müßte man voraussetzen, daß sich unter den Stoffen, welche toxisch und immunisierend auf Kaninchen wirken, solche vorfinden, welche die Umsetzung in ungiftige, reversible Modifikationen gestatten, während andere unter absolut identischen Bedingungen von der Säure gar nicht angegriffen werden; eine dritte Gruppe würde endlich nicht in reversible, sondern in irreversibel atoxische Spaltprodukte umgesetzt werden. „Toxin γ" müßte dann Toxine der ersten und zweiten Art, „Toxin Toba I" nur solche der ersten und dritten, „Toxin Toba VIII" nur solche der dritten Art enthalten. Beweisen läßt sich diese Konzeption nicht, und sie soll daher in Anbetracht ihres geringen inneren Wertes nicht weiter besprochen werden.

IV. Partielle Regeneration der durch Säure inaktivierten giftigen Bouillonkulturfiltrate.

Vergegenwärtigt man sich nochmals, was auf Grund der bisher mitgeteilten Versuche über den Einfluß des Säurequantums auf die Ausbeute an reversiblen, atoxischen und nicht antigenen Toxinderivaten ermittelt werden konnte, so lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse folgendermaßen formulieren:

1. Geht man von *verschiedenen Bouillonkulturfiltraten* aus, welche dasselbe Gift (z. B. Dysenterietoxin), aber in verschiedener Konzentration enthalten, so ist es vorderhand aus unbekannten Gründen nicht möglich, aus jeder beliebigen Giftlösung die gleiche Menge des reversiblen Produktes durch entsprechende Variierung der Versuchsbedingungen, speziell durch Abstufung der zugefügten Säuremengen bzw. durch Herstellung der geeigneten H'-Konzentration darzustellen.

2. Verwendet man dagegen *ein und dasselbe Bouillonkulturfiltrat* („Dysenterietoxin"), so hängt die Menge des entstehenden reversiblen Produktes in hohem Grade vom zugesetzten Säurequantum bzw. von der erzeugten H'-Konzentration ab, derart, daß die Ausbeute mit der H'-Konzentration wächst. Diese Erscheinung läßt sich auch so in Worte kleiden, daß sich Toxin, reversibles Toxinderivat und Wasserstoffionen ins Gleichgewicht setzen und daß dieser Gleichgewichtszustand für jeden p_H ein anderer ist. Natürlich gilt dieses Gesetz nur für ein ganz bestimmtes Intervall der H'-Konzentration, welches derzeit noch nicht genau fixiert werden kann, da es für verschiedene Toxinarten verschieden ist und in geringerem Grade auch bei verschiedenen Lösungen (Bouillonkulturfiltraten) desselben Toxins variiert; bei einem genauer studierten „Dysenterietoxin" („Toxin γ") war das Intervall durch die Wasserstoffexponenten 6,0 und 2,5 approximativ begrenzt.

Soll die Vorstellung eines derartigen Gleichgewichtszustandes richtig sein, so muß jede Änderung der H'-Konzentration innerhalb des gedachten Intervalls auch eine Verschiebung der Mengenverhältnisse von Toxin und reversiblem Toxinderivat nach sich ziehen. Was damit gemeint ist, wird durch ein Beispiel klarer werden. Bezeichnet man die Mengen des Toxins (in seiner Ausgangsform) mit großen, jene des Toxinderivates mit kleinen Buchstaben und nimmt man weiter an, daß ein bestimmtes Volum des nativen Bouillonkulturfiltrates eine Toxinmenge = A enthält, so wird diese Menge durch den Säurezusatz vermindert, und zwar um jenen Betrag, der in die reversible Modifikation umgesetzt wurde und den wir a nennen wollen. Das Reaktionsvolum enthält somit nunmehr A—a Toxin und a reversible Modifikation. Wird jetzt die gesamte zugefügte Säuremenge durch Alkali neutralisiert und verläuft der Reaktivierungsprozeß ideal, d. h. vollständig, so kehrt die Lösung wieder zum Ausgangszustand zurück und verhält sich so, als ob sie A-Toxin und kein reversibles (ungiftiges) Derivat enthalten würde. Stumpft man aber nur einen Teil der Säure durch Alkali ab, dann müßte — wenn die Voraussetzung stimmt — nur eine Quote des reversiblen Derivates in Toxin rückverwandelt werden und die Prüfung der Toxizität des partiell neutralisierten Gemenges müßte ein Resultat ergeben, welches der Formel $A—{}^a/_n$ Toxin plus ${}^a/_n$ atoxisches Derivat entspräche. Man sollte somit erwarten, daß die partielle Neutralisation

einer durch Säure inaktivierten Giftlösung nur einen Teil der Ausgangstoxizität, die vollständige Neutralisation den ursprünglich vorhandenen Giftwert zum Vorschein bringt. Das ist nun de facto der Fall, und es ist uns in einem Falle gelungen, ein Experiment durchzuführen, auf welches das obige Schema ohne Änderung anwendbar ist.

Das „Toxin γ" wirkte in Mengen von 0,025 ccm auf Kaninchen von 1500 g intravenös injiziert sicher tödlich; Dosen von 0,01 ccm waren bereits ausnahmslos unwirksam.

27 ccm dieses Toxins wurden nun mit 3 ccm $^{0,81}/_{n}$-HCl versetzt; das Gemenge, dessen $p_H = 2{,}39$ betrug, blieb 24 Stunden bei 20° C stehen und sodann in steigenden Dosen Kaninchen intravenös injiziert:

Kaninchen	BA 34	1370 g	0,10 ccm	Symptomlos.
„	BA 35	1500 g	0,25 ccm	„
„	BA 36	1370 g	**0,50** ccm	† in 6 Tagen; vorher Lähmungen.
„	BA 37	1350 g	1,00 ccm	† in 5 Tagen; vorher totale Lähmung.

Nun wurden 10 ccm der angesäuerten Giftlösung mit der äquivalenten Menge $^{0,81}/_{n}$-NaOH versetzt (1 ccm) und nach 2stündigem Stehen bei 20° C ausgewertet:

Kaninchen	BA 38	1550 g	**0,025** ccm	nach 3 Tagen Lähmungen, in 10 Tagen †.
„	BA 39	1400 g	0,050 ccm	† in 3 Tagen.
„	BA 40	1550 g	0,100 ccm	† in 4 „
„	BA 41	1370 g	0,250 ccm	† innerhalb von 24 Stunden.
„	BA 42	1450 g	0,500 ccm	† „ „ 24 „

Weitere 10 ccm der angesäuerten Giftlösung erhielten einen Zusatz von 0,5 ccm nNaOH und 0,5 ccm NaCl-Lösung (Neutralisation des halben Säurequantums; nach 2 Stunden ausgewertet, belief sich die Toxizität auf 0,1 ccm.

Kaninchen	BA 43	1400 g	0,025 ccm	Symptomlos.
„	BA 44	1450 g	0,050 ccm	„
„	BA 45	1550 g	**0,100** ccm	† in 3 Tagen; Cöcalödem.
„	BA 46	1400 g	0,250 ccm	† innerhalb von 24 Stunden.
„	BA 47	1400 g	0,500 ccm	† „ „ 24 „

Die Dosis letalis minima betrug also:

für das native „Toxin γ"	**0,025** ccm
„ „ angesäuerte „Toxin γ"	**0,500** ccm
„ „ vollkommen neutralisierte „Toxin γ" . . .	**0,025** ccm
„ „ partiell (zur Hälfte) neutralisierte „Toxin γ"	**0,100** ccm

Der Sicherheit halber wurde ein ganz analoger Versuch auch noch mit einem *Diphtherietoxin* (Bestimmung der Toxizität durch subcutane Injektion der Lösungen bei Meerschweinchen von 250 g) angesetzt. Das Resultat war im Prinzip das gleiche, nur mit dem Unterschiede, daß die völlige Reaktivierung des Giftes auch durch komplette Neutralisation der zur Inaktivierung verwendeten Säure nicht gelang.

Die Dosis letalis minima betrug in diesem Falle:

für das native Diphtherietoxin	**0,004** ccm
„ „ angesäuerte Gift	**0,094** ccm
„ „ komplett neutralisierte	**0,018** ccm
„ „ partiell neutralisierte	**0,037** ccm

Die Frage nach dem Wesen der Inaktivierungs- und Reaktivierungsreaktion der Toxine kann vorläufig nur vermutungsweise und unter Vorbehalt beantwortet werden. Drei Möglichkeiten lassen sich u. E. auf Grund der hier mitgeteilten Versuchsresultate ausschließen:

1. Daß die Säure zu einer *rein physikalischen Zustandsänderung* der (kolloid vorgestellten) Toxinpartikel führt, welche zur Folge hat, daß die modifizierten Toxinteilchen mit den giftempfindlichen Zellen und den antikörperproduzierenden Geweben nicht mehr in Wechselwirkung treten können, sondern auf blande Art vom Organismus verarbeitet oder ausgeschieden werden. Dagegen spricht die Tatsache, daß unter bestimmten Bedingungen unverändertes Toxin und atoxische, reversible Produkte nebeneinander bestehen können und daß die letzteren durch partielle Neutralisation der Säure (also bei Aufrechterhaltung der sauren Reaktion) zum Teil wieder in das ursprüngliche Gift revertiert werden. Ebensowenig kann die Ursache der Inaktivierung des Toxins durch Säure in einem bloßen Unlöslichwerden desselben, die der Reaktivierung in der Wiederherstellung der Wasserlöslichkeit gesucht werden. Optisch ließen sich überdies solche Zustandsänderungen in Form von Flockungen nicht konstatieren.

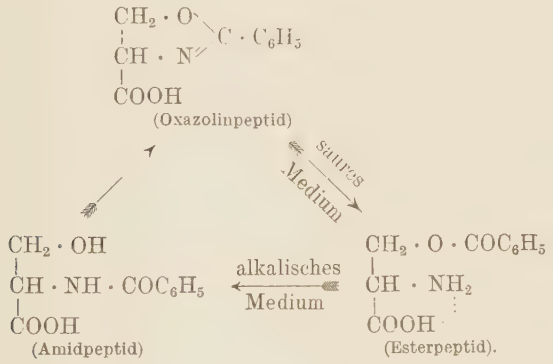
2. Die gleichzeitig mit dem Toxin einverleibte Säure läßt sich für die Unwirksamkeit bzw. für die geringere Wirksamkeit der angesäuerten Giftlösungen nicht verantwortlich machen.

3. Direkte Umsetzungen zwischen Toxin und Säure etwa im Sinne *einfacher Salzbildungen* sind schon deshalb höchst unwahrscheinlich, weil die Säuren stets im Überschuß zugesetzt werden müssen und dieser Überschuß in der Intervention von mit Säure reagierenden Begleitsubstanzen der toxischen Bouillonkulturfiltrate keine Erklärung findet.

Am plausibelsten erscheint bei dem derzeitigen Stande der Untersuchungen *eine intramolekulare Umlagerung*, die in den wässerigen Toxinlösungen einsetzt, sobald die Wasserstoffionen über die Hydroxylionen überwiegen, und die je nach der Temperatur und der Wasserstoffionenkonzentration mit variabler Geschwindigkeit fortschreitet. Beispiele für solche intramolekulare Umlagerungen, die schon bei relativ niedrigen Wasserstoffionenkonzentrationen eintreten und durch Alkalien wieder reversibel sind, kennt man aus der chemischen Literatur in genügender Zahl. Es sollen nur zwei Paradigmen dieser Art angeführt werden, welche zu dem hier diskutierten Problem in näherer Beziehung stehen.

Das eine betrifft einen Proteinbaustein, und zwar die Oxyaminosäure *Serin* und ist eben deshalb besonders wertvoll, weil die Toxine als niedermolekulare Proteide ziemlich allgemein definiert werden. *Bergmann* und *A. Miekeley* stellten aus dem Serin das N-Benzoylserin dar, einen Körper, welcher den Benzoylrest (die vereinfachte Peptidbindung) am

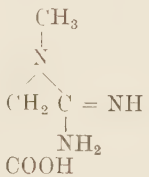
Stickstoff trägt. Diesen Körper vermochten sie in ein zweites Benzoylserin umzuwandeln, das den Benzoylrest am Sauerstoff trägt, keine Säureamidgruppe mehr enthält, dafür aber eine Estergruppe, und daher von *Bergmann* als Esterpeptid bezeichnet wird. Zwischen diesen beiden Körpern stand ein dritter Stoff, bei welchem der maskierte Benzoylrest gleichzeitig mit dem O und dem N in Verbindung war, *so daß sein Ringsystem, und zwar ein Oxazolinring resultierte.* Für unsere Betrachtungen erscheint es nun besonders wichtig, daß zwischen den drei bezeichneten Substanzen ein enger genetischer Zusammenhang nachweisbar war. Das Oxazolinpeptid war in neutraler oder alkalischer Lösung recht beständig, wurde aber in saurem Medium (und zwar schon bei verhältnismäßig geringen Wasserstoffionenkonzentrationen) in kurzer Zeit zur Gänze in das Esterpeptid umgesetzt, das wieder in saurer Lösung unverändert blieb, beim Abstumpfen der Carboxylgruppe durch Salzbildung jedoch in wenigen Minuten in das Amidpeptid (N-Benzoylserin) überging. Die sukzessiven Umwandlungen der „drei proteinverwandten Stoffe" ineinander veranschaulicht *Max Bergmann* durch folgendes Formelschema:



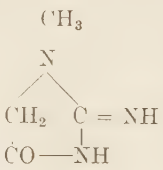
Wenn man in diesem Schema an Stelle des Oxazolinpeptids das native Toxin, an Stelle des Esterpeptids das atoxische Toxinderivat substituiert und die Tatsache vernachlässigt, daß die Rückverwandlung des Esterpeptids in die Ausgangsform (das Oxazolinpeptid) über eine Zwischenstufe (das Amidpeptid) führt, welche uns vorläufig bei der Toxinsäurereaktion noch unbekannt ist, so hat man offensichtlich den Fall vor sich, der uns hier beschäftigt. Von höchstem Interesse ist dabei der Umstand, daß bei den von *Bergmann* und *Miekeley* studierten Transformationen der Peptide ein (im Oxazolinpeptid) vorhandenes Ringsystem in saurem Medium in eine offene Kette übergeht und daß die Abstumpfung der Carboxylgruppe des Esterpeptids durch Zusatz von Alkalien (die Salzbildung) die Regeneration der originären cyclischen

Konstitution einleitet. Wie in Kapitel 1 gezeigt wurde, büßt das Toxin in saurem Medium nicht nur seine Giftigkeit, sondern auch seine aktiv immunisierende Wirkung (seine Antigenfunktion) ein und gewinnt beide Eigenschaften bei der Reaktivierung durch Alkalien wieder zurück. Nun ist es aber — seit *Obermayer* und *E. P. Pick* zum ersten Male diese Ansicht geäußert haben — immer wahrscheinlicher geworden, daß das Vorhandensein aromatischer Kerne eine der notwendigen chemischen Bedingungen für die Antigenfunktion organischer Verbindungen darstellt, womit ja auch — in parenthesi bemerkt — die Erfahrung übereinstimmt, daß die synthetischen Polypeptide von *E. Fischer* (Amidpeptide) nicht immunisatorisch wirken, selbst wenn man Ketten aus 18 oder mehr Aminosäuren aufbaut. Es ist daher gewiß nicht gewagt, wenn man annimmt, daß der Verlust der Toxizität und der Antigenfunktion, welchen die Toxine in saurem Medium erleiden, auf der Umlagerung cyclischer Systeme in offene Ketten beruht, und daß die Reaktivierung chemisch durch die Restitution der ursprünglichen ringförmigen Atomgruppierungen verursacht wird.

Das zweite Beispiel wäre das *Kreatin*,



das in 1proz. Lösung beim 3—4stündigen Erwärmen mit n HCl auf dem Wasserbade in *Kreatinin*



übergeht. Die Rückverwandlung tritt beim Behandeln mit Alkalien ein. Dieses Beispiel besitzt indes geringere Bedeutung, da die saure Reaktion den Ring schließt, während ihn die Abstumpfung der Säure öffnet; wie auseinandergesetzt wurde, nötigen die herrschenden Auffassungen über die chemischen Grundlagen der Antigenfunktionen, für die Inaktivierung und Reaktivierung der Toxine gerade das entgegengesetzte Verhalten anzunehmen, falls man sich überhaupt entschließt, den Mechanismus der genannten Vorgänge im Übergehen cyclischer in offene bzw. offener in cyclische Atomgruppierungen zu verlegen.

Zusammenfassung.

1. Wässerige Lösungen von Dysenterie- oder Diphtherietoxin (Bouillonkulturfiltrate) werden durch Zusatz von Säuren entgiftet; durch Abstumpfung der Säure mit Alkalien läßt sich die Toxizität wiederherstellen (*Doerr*).

2. Gleichzeitig mit der Giftwirkung wird das antigene Vermögen (die aktiv immunisierende Wirkung) des Toxins aufgehoben bzw. reaktiviert. *Es lassen sich somit Antigene auf die bezeichnete Art in Nicht-Antigene verwandeln und umgekehrt Nicht-Antigene in Antigene umsetzen.*

3. Die Inaktivierung der Toxine durch Säure ist ein chemischer Prozeß, dessen Ablauf in erster Linie von der hergestellten Wasserstoffionenkonzentration abhängt, derart, daß innerhalb eines bestimmten Intervalles der unabhängig Variablen die entstehende Menge der atoxischen, nichtantigenen und reversiblen Toxinmodifikation mit der $H^{\cdot}$-Konzentration zunimmt. Bei einer bestimmten $H^{\cdot}$-Konzentration wächst die erzielte Ausbeute an ungiftigen, reversiblem Toxinderivat mit der seit Beginn der Reaktion verstrichenen Zeit; die Reaktion vollzieht sich somit nicht plötzlich, sondern schreitet durch mehrere Stunden fort, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten Sekunden eine bedeutende ist und späterhin auf geringere Werte absinkt.

4. Aus diesen Reaktionsbedingungen ergibt sich die Konsequenz, daß man in angesäuerten Giftlösungen unter Umständen neben der atoxischen, reversiblen Modifikation noch unverändertes Toxin findet; solche Lösungen besitzen daher noch einen entsprechenden Grad von Toxizität und vermögen natürlich auch (in genügender Menge injiziert) aktive antitoxische Immunität hervorzurufen, wodurch bei mangelhafter Versuchsanordnung (unzureichender Auswertung der sauren Lösungen) antigene Eigenschaften der atoxischen, reversiblen Modifikation vorgetäuscht werden können. Wichtig ist die Tatsache, daß es in einzelnen Experimenten gelang, die Toxizität und die Antigenfunktion (soweit nachweisbar) völlig auszulöschen und durch Abstumpfung der Säure quantitativ wieder zum Vorschein zu bringen, d. h. die gesamte Toxinmenge in die reversible Modifikation umzuwandeln; ob sich dieses Resultat erzielen läßt oder nicht, scheint bei derselben Toxinart von (zur Zeit noch nicht bestimmten) besonderen Eigenschaften der verwendeten Bouillonkulturfiltrate abzuhängen.

5. Als Nebenprodukte entstehen bei der Säureeinwirkung häufig atoxische, irreversible Toxinabkömmlinge, d. h. ein Teil des Toxins wird endgültig deterioriert (zersetzt).

6. Um die reversiblen Derivate in das Toxin zurückzuverwandeln, genügt es, wenn man die zugesetzte Säure durch äquivalente Mengen Alkali (Natronlauge) abstumpft. Überalkalisieren beeinträchtigt die

Reversion. Partielle Neutralisation der Säure bewirkt eine partielle Regeneration des Toxins. Die der Reaktivierung zugrunde liegende chemische Reaktion verläuft ungleich rascher wie die Inaktivierung und ist anscheinend in kürzester Zeit nach dem Zusatze des Alkalis beendet.

7. An der Hand von Analogien aus der Eiweißchemie, speziell auf Grund der von *M. Bergmann* studierten Eigenschaften des N-Benzoylserins und verwandter Peptide, wird die Hypothese aufgestellt und motiviert, daß die Säureinaktivierung der Toxine auf einer intramolekularen Umlagerung beruht, welche eine Transformation bestimmter, im Toxinmolekül vorhandener, die Toxizität und namentlich die Antigenfunktion bedingender Ringsysteme in offene Ketten zur Folge hat. Die Reaktivierung wäre dann der physiologische Ausdruck der Rückverwandlung der offenen Ketten in die ursprüngliche cyclische Atomgruppierung.

Die Annahme, daß im Toxinmolekül unbeständige, schon bei relativ geringfügigen Eingriffen zerfallende Ringsysteme vorkommen, harmoniert übrigens auch mit der bekannten, so außerordentlich großen Labilität dieser Stoffe, die ihre strukturelle Erforschung bisher in hohem Maße erschwert hat. Vielleicht bietet die hier beschriebene Reaktion infolge ihrer Reversibilität ein Mittel, um zu präziseren Anschauungen über die Konstitution der Toxine und damit auch zu exakteren Vorstellungen über die chemischen Grundlagen der Antigenfunktion zu gelangen.

8. Andere reversible, durch biologische Methoden nachweisbare Reaktionen der Toxine konnten nicht ermittelt werden. Die Entgiftungen von Toxinlösungen durch Hydroxylionen (Alkali) oder durch Formol erwiesen sich in einigen, mehrfach variierten Versuchen als irreversibel.

Literaturverzeichnis.

Roux und *Yersin*, Ann. de l'inst. Pasteur 1889. — *Chantemesse*, IX. internat. Kongr. f. Hygiene u. Dermographie 1898. — *Ritchie*, Journ. of hyg. 1904. — *Doerr*, Wien. klin. Wochenschr. 1907. — *Doerr*, Biochem. Zeitschr. 7. 1907. — *Arrhenius*, Immunochemie. Leipzig 1907. — *Morgenroth*, Berl. klin. Wochenschr. 1905, Festschrift zur Eröffnung des Pathologischen Instituts Berlin 1906 und Biochem. Zeitschr. 1907. — *Fermi* und *Pernossi*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1894. — *Morgenroth* und *Pane*, Biochem. Zeitschr. 1906. — *Kirschbaum*, Wien. klin. Wochenschr. 1914. — *S. Fränkel*, ebenda. — *Bergmann, M.*, Naturwissenschaften 1924 (daselbst Literatur und genauere Angaben über die hier besprochenen Peptide). — *Dorner*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1907 (Literatur über Kreatin und Kreatinin).

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses! Seite

Lange, B. Beiträge zur Methodik der Desinfektionsmittelprüfung. III. Mitteilung. Die Prüfung des Desinfektionserfolges durch Kultur und Tierversuch 214
Feldt, Adolf, und **Alix Schott.** Empfänglichkeit junger und alter Mäuse für Recurrens 241
Kroó, H. Beitrag zur Immunbiologie der Trypanosomen. Über Stammeinheit und Arteinheit des Trypanosoma brucei 247
Bieling, R. Weitere Untersuchungen über die aktive Immunisierung unterernährter Tiere 254

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN W 9

Soeben erschien:

ALLGEMEINE PATHOLOGIE

Von

DR. N. PH. TENDELOO

o. ö. Professor der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie
Direktor des Pathologischen Instituts der Reichsuniversität Leiden

ZWEITE, VERBESSERTE UND VERMEHRTE AUFLAGE

1052 Seiten mit 368 zum Teil farbigen Abbildungen im Text

66 Goldmark. In Leinen gebunden 69 Goldmark

*

Aus dem Inhalt:

Erster Abschnitt: **Allgemeine Begriffe.** Zweiter Abschnitt: **Allgemeine Ätiologie und Pathogenese.** Krankmachende Faktoren / Physikalische krankmachende Faktoren / Chemische und physikochemische krankmachende Faktoren / Ursächliche Faktoren zusammengesetzter oder nicht zu deutender Natur / Infektion / Abnorme Grade der Giftempfindlichkeit / Konstitution, Anlage, Disposition, Temperament, Diathese / Mißbildungen (Teratologie oder Dysontogenie) / Erblichkeit. Heredität / Krankheitsverlauf. Mögliche Ausgänge. Individuelle Verschiedenheiten. Diagnose und Prognose. Dritter Abschnitt: **Örtliche Störungen der Ernährung, des Stoffwechsels und der Tätigkeit.** Einleitung, Hypertrophie und Atrophie / Dystrophien, Degenerationen, Nekrose und Gangrän / Ausfall und Ablagerung von Salzen / Entzündung / Entzündung (Folge), „Spezifische" Enzündungen, die sogenannten infektiösen Granulationsgeschwülste / Örtliche Störungen usw. Heilungsvorgänge, Verpflanzung, Metaplasie / Die Geschwülste. Vierter Abschnitt: **Allgemeine Störungen der Ernährung, des Stoffwechsels und der Tätigkeit.** Allgemeine Störungen des Stoffwechsels / Allgemeine Störungen des Wachstums und des Stoffwechsels, insbesondere im Zusammenhang mit Störungen innerer Sekretionen / Störungen des Wärmehaushalts / Das Blut und die Blutverteilung / Intravaskuläre Gerinnung, Thrombrose und Embolie / Allgemeine Blutbewegung. Herztätigkeit / Intrathorakale und intraabdominale Druck- und Spannungsverhältnisse / Lungen und Atmung / Verdauung und Resorption / Störungen der Nierentätigkeit / Störungen der Tätigkeit des Zentralnervensystems.

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN W 9

Handbuch der Inneren Medizin

Begründet von **L. Mohr** † und **R. Staehelin**

Zweite Auflage

Bearbeitet von bekannten Fachärzten

Herausgegeben von

Professor Dr. G. v. Bergmann und **Professor Dr. R. Staehelin**
Direktor der medizinischen Universitäts-Klinik in Frankfurt a. M. — Direktor der medizinischen Universitäts-Klinik in Basel

Erster Band:

Infektionskrankheiten

Erster Teil

730 Seiten mit 232 zum Teil farbigen Abbildungen — 1925

In Leinen gebunden 45 Goldmark

Exotische Krankheiten

Ein kurzes Lehrbuch für die Praxis

Von

Professor Dr. med. Martin Mayer
Abteilungsvorsteher am Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten
Privatdozent an der Universität Hamburg

310 Seiten mit 210 zum großen Teil farbigen Abbildungen — 1924

24 Goldmark; gebunden 25 Goldmark

G. Jochmann's Lehrbuch der Infektionskrankheiten

für Ärzte und Studierende

Zweite Auflage

unter Mitwirkung von

Dr. B. Nocht und **Dr. E. Paschen**
o. ö. Professor, Direktor des Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten zu Hamburg — Professor, Oberimpfarzt, Direktor der Staatsimpfanstalt zu Hamburg

neu bearbeitet von

Dr. C. Hegler
a. o. Professor der Universität,
stellvertret. Direktor des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-St. Georg

1085 Seiten mit 464 zum großen Teil farbigen Abbildungen — 1924

54 Goldmark; gebunden 57 Goldmark

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig